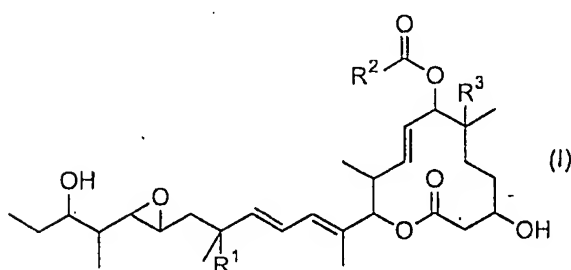


## 明細書

## 抗癌剤に対する癌細胞の感受性を検定する方法

## 技術分野

本発明は、抗癌剤として有用な式 (I) の一般式で表される化合物（以下、本化合物と称す）に対する癌細胞の感受性を予測するための検定方法に関する。



## 背景技術

従来の癌化学療法においては、臓器癌種毎に効果の立証されている抗癌剤を、単剤またはそれらの併用で行ってきた。また、近年の盛んに行われている大規模な無作為比較試験を通して、特定の癌種においては標準治療が確立されている。しかしながら、これらの治療において達成される奏効率は、概して 20～50%程度であり、半数以上の患者においては治療効果を享受できないにも関わらず、副作用の危険性を伴う化学療法を施行するという状況である (JACR Monograph No. 7, 10-19, 2002)。

抗癌剤が効く患者と効かない患者を選別しようという試みは、従来から「薬剤感受性試験」という方法が試されてきた。抗癌剤感受性試験には SDI 法 (Jpn J Cancer Res. 85: 762-765, 1994)、CD-DST 法 (Jpn J Cancer Res. 92: 203-210, 2001)、HDRA 法 (Clin Cancer Res. 1: 305-311, 1995) などがあり、いずれも患者から癌細胞を採り、抗癌剤を接触させて抗癌剤に対する感受性を調べる方法であることで共通している。しかしながら、これらの方法は、癌細胞を試験管内で生存させておく必要があることや、更に検査結果と臨床効果が必ずしも一致しないという問題な

どがあり、実施率も 0.5%程度にとどまっている（制癌剤適応研究会集計アンケート 1996）。

癌細胞に特異的な分子を標的とした分子標的薬剤の中には、ハーセプチンテストなどのように分子診断によって薬剤に対する感受性を予測することに成功している例も報告されている（Clin Cancer Res. 7: 1669-1675, 2001）。しかしながら、その他の薬剤においては単独の標的分子のみでは感受性を予測出来ず、複数の分子が感受性を規定している場合が多いと考えられている（Nat Genet. 24: 236-244, 2000）。近年発展した cDNA マイクロアレイ技術は超多量遺伝子の発現解析を可能とし、感受性規定因子の包括的解析を可能にした。例えば、慢性骨髄性白血病治療薬のグリーベックの場合は、15~30 の遺伝子群の発現解析により治療効果の予測可能であることが、cDNA マイクロアレイ解析の結果から提唱されている（Jpn J Cancer Res. 93: 849-56, 2002）。

今後の癌化学療法で用いられる抗癌剤の開発は、治療前にその感受性を調べる診断法と組み合わせた提供を目指すべきであり、分子診断を可能にするためには開発する薬剤への感受性を予測できる分子を見出すことが重要となる。

#### 発明の開示

本発明者らは WO 02/060890、WO 03/099813 及び WO 04/011661 において、本化合物が、ヒト乳癌細胞株（BSY-1）に対し極めて強い抗腫瘍効果を発現し、ヒト大腸癌細胞株（WiDr）に対しても強い抗腫瘍効果を発現することを見出した。

一方で、本化合物は小細胞性肺癌細胞株（Calu-1）に対しては、上述した癌細胞株と比べて効果が弱いことを見出し、本化合物の抗腫瘍効果が、癌細胞により異なることが明らかとなった。

癌細胞の本化合物に対する感受性と関連する分子を明らかにし、生検等により癌患者から採取した癌細胞で、それら分子の発現を調べることにより、本化合物に対する癌細胞の感受性を予測することができれば、本化合物の抗腫瘍効果が期待できる癌患者のみに、本化合物を投与することが可能となり、治療効果を高め不要な副作用を軽減できることが期待される。

本化合物に対する感受性の高い BSY-1 株の分子的特徴を探索するにあたり、本発明者らは乳癌や肺癌において破綻していることが提唱されている細胞周期の G1/S 移行を制御する分子群に着目した。癌抑制遺伝子である p16 と pRB、及びそれらと拮抗する、またはそれらを負に制御する cyclin D1 と cyclin E の 4 分子に関して、蛋白質発現量を調べたところ、BSY-1 株には pRB の発現減少、p16 発現陽性、cyclin E 高発現という分子的特徴があることを見出した。

BSY-1 株、WiDr 株及び Calu-1 株を含むヒト癌細胞株 25 株について、pRB の発現減少若しくは変異（以下 pRB 低発現と称す）、p16 発現陽性または cyclin E 高発現という特徴を調べ、これら癌細胞を移植したマウスを用いて本化合物の抗腫瘍効果を比較検討したところ、これら特徴を一つでも有していたヒト癌細胞株の多くが本化合物に対する高い感受性を示したのに対し、有していない癌細胞株のほとんどは低感受性であった。

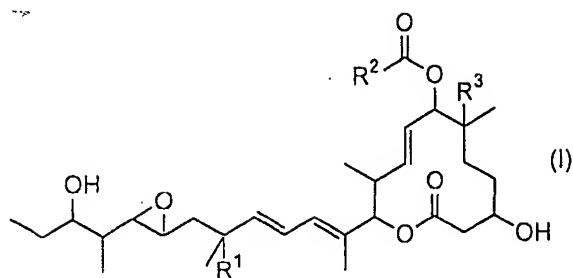
特に pRB 低発現及び cyclin E 高発現の特徴を有する 7 株、p16 発現陽性及び cyclin E 高発現の特徴を有する 6 株のうち、4 株は本化合物投与により完全な腫瘍の消失を示し、1 株は消失はしないまでも長期間にわたる腫瘍縮小の継続を示した。

癌細胞の pRB 低発現、p16 発現陽性または cyclin E 高発現という特徴を調べることにより、当該癌細胞の本化合物に対する感受性を予測できることが明らかとなり、本発明を完成させるに至った。

すなわち本発明は、以下に関する。

1. 1) pRB の発現が減少している、
  - 2) p16 が発現している、
  - 3) cyclin E の発現が増強している、
  - 4) pRB の発現が減少しかつ cyclin E の発現が増強している、または
  - 5) p16 が発現しかつ cyclin E の発現が増強している、の何れか一つを指標とする、
- 下記一般式 I で表される化合物に対する癌細胞の感受性を検定する方法。

式 (I)



[式中、R<sup>1</sup>は

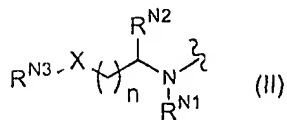
- 1) 水素原子または
- 2) 水酸基

R<sup>3</sup>は

- 1) 水素原子、
- 2) 水酸基または
- 3) C<sub>1-6</sub>アルコキシ基

R<sup>2</sup>は

- 1) 水素原子、
- 2) 置換基を有していても良いC<sub>1-6</sub>アルキル基、
- 3) 置換基を有していても良いC<sub>7-10</sub>アラルキル基、
- 4) 置換基を有していても良い5ないし14員環ヘテロアラルキル基
- 5) 式 (II)



[式中、

A)

nは0ないし4の整数、

Xは

i)  $-\text{CHR}^{\text{N}^4}-$ 、

ii)  $-\text{NR}^{\text{N}^5}-$ または

iii)  $-\text{O}-$ 、

$\text{R}^{\text{N}^1}$  及び  $\text{R}^{\text{N}^2}$  は同一または異なって、

i) 水素原子または

ii)  $\text{C}_{1-6}$  アルキル基、

$\text{R}^{\text{N}^3}$  及び  $\text{R}^{\text{N}^4}$  は同一または異なって、

i) 水素原子、

ii) 置換基を有していても良い  $\text{C}_{1-6}$  アルキル基、

iii) 置換基を有していても良い不飽和  $\text{C}_{2-10}$  アルキル基、

iv) 置換基を有していても良い  $\text{C}_{1-6}$  アルコキシ基、

v) 置換基を有していても良い  $\text{C}_{6-14}$  アリール基、

vi) 置換基を有していても良い 5 ないし 14 員環ヘテロアリール基、

vii) 置換基を有していても良い  $\text{C}_{7-10}$  アラルキル基、

viii) 置換基を有していても良い  $\text{C}_{3-8}$  シクロアルキル基、

ix) 置換基を有していても良い  $\text{C}_{4-9}$  シクロアルキルアルキル基、

x) 置換基を有していても良い 5 ないし 14 員環ヘテロアラルキル基、

xi) 置換基を有していても良い 5 ないし 14 員環非芳香族複素環式基、

xii)  $-\text{NR}^{\text{N}^6}\text{R}^{\text{N}^7}$  (ここにおいて、 $\text{R}^{\text{N}^6}$  および  $\text{R}^{\text{N}^7}$  は同一または異なって、水素原子または  $\text{C}_{1-6}$  アルキル基を表す) または

xiii)  $\text{R}^{\text{N}^3}$  及び  $\text{R}^{\text{N}^4}$  が一緒になって結合する炭素原子と共に形成する置換基を有していても良い 5 ないし 14 員環非芳香族複素環式基 (該非芳香族複素環式基は置換基を有していても良い) 、

$\text{R}^{\text{N}^5}$  は

i) 水素原子、

ii) 置換基を有していても良い  $\text{C}_{1-6}$  アルキル基、

iii) 置換基を有していても良い不飽和  $\text{C}_{2-10}$  アルキル基、

iv) 置換基を有していても良い  $\text{C}_{6-14}$  アリール基、

- v) 置換基を有していても良い5ないし14員環ヘテロアリアル基、
- vi) 置換基を有していても良いC<sub>7-10</sub>アラルキル基、
- vii) 置換基を有していても良いC<sub>3-8</sub>シクロアルキル基、
- viii) 置換基を有していても良いC<sub>4-9</sub>シクロアルキルアルキル基、
- ix) 置換基を有していても良い5ないし14員環ヘテロアラルキル基、
- x) 置換基を有していても良い5ないし14員環非芳香族複素環式基または
- xi) R<sup>N3</sup>及びR<sup>N5</sup>が一緒になって結合する窒素原子と共に形成する置換基を有していても良い5ないし14員環非芳香族複素環式基（該非芳香族複素環式基は置換基を有していても良い）、

B)

X、n、R<sup>N3</sup>、R<sup>N4</sup>及びR<sup>N5</sup>は前記定義の基を表し、R<sup>N1</sup>及びR<sup>N2</sup>は一緒になって形成する置換基を有していても良い5ないし14員環非芳香族複素環式基、

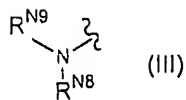
C)

X、n、R<sup>N2</sup>、R<sup>N4</sup>及びR<sup>N5</sup>は前記定義の基を表し、R<sup>N1</sup>及びR<sup>N3</sup>は一緒になって形成する置換基を有していても良い5ないし14員環非芳香族複素環式基あるいは

D)

X、n、R<sup>N1</sup>、R<sup>N4</sup>及びR<sup>N5</sup>は前記定義の基を表し、R<sup>N2</sup>及びR<sup>N3</sup>は一緒になって形成する置換基を有していても良い5ないし14員環非芳香族複素環式基を表す]または

6) 式 (III)



[式中、R<sup>N8</sup>及びR<sup>N9</sup>は同一または異なって、

- i) 水素原子、
- ii) 置換基を有していても良いC<sub>1-6</sub>アルキル基、

- iii) 置換基を有していても良い  $C_{6-14}$  アリール基、
  - iv) 置換基を有していても良い 5 ないし 14 員環ヘテロアリール基、
  - v) 置換基を有していても良い  $C_{7-10}$  アラルキル基または
  - vi) 置換基を有していても良い 5 ないし 14 員環ヘテロアラルキル基を表す]
- を表す]

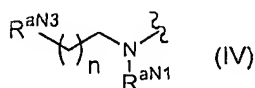
## 2. $R^2$ が

- 1) 水素原子、
- 2) 置換基を有していても良い  $C_{1-6}$  アルキル基、
- 3) 置換基を有していても良い  $C_{7-10}$  アラルキル基または
- 4) 置換基を有していても良い 5 ないし 14 員環ヘテロアラルキル基である 1 に

記載の検定方法。

## 3. $R^2$ が下記式 (IV) で表される 1 に記載の検定方法。

式 (IV)



[式中、 $n$  は 0 ないし 4 の整数、

$R^{\text{aN}1}$  は

- 1) 水素原子または
- 2)  $C_{1-6}$  アルキル基、

$R^{\text{aN}2}$  は

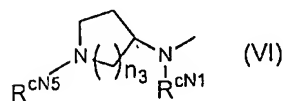
- 1) 水素原子
- 2)  $N-C_{1-6}$  アルキルアミノ基、
- 3)  $N, N$ -ジ  $C_{1-6}$  アルキルアミノ基、
- 4) エチルメチルアミノ基、
- 5) ピリジル基、
- 6) ピロリジン-1-イル基、

- 5) 置換基を有していても良いC<sub>6-14</sub>アリール基、
- 6) 置換基を有していても良い5ないし14員環ヘテロアリール基、
- 7) 置換基を有していても良いC<sub>7-10</sub>アラルキル基、
- 8) 置換基を有していても良いC<sub>3-8</sub>シクロアルキル基、
- 9) 置換基を有していても良いC<sub>4-9</sub>シクロアルキルアルキル基、
- 10) 置換基を有していても良い5ないし14員環ヘテロアラルキル基、
- 11) -NR<sup>bN6</sup>R<sup>bN7</sup> (ここにおいて、R<sup>bN6</sup>およびR<sup>bN7</sup>は、同一または異なって、水素原子またはC<sub>1-6</sub>アルキル基を表す) または

12) 置換基を有していても良い5ないし14員環非芳香族複素環式基、  
R<sup>bN5</sup>は

- 1) 水素原子、
  - 2) 置換基を有していても良いC<sub>1-6</sub>アルキル基、
  - 3) 置換基を有していても良い不飽和C<sub>2-10</sub>アルキル基、
  - 4) 置換基を有していても良いC<sub>6-14</sub>アリール基、
  - 5) 置換基を有していても良い5ないし14員環ヘテロアリール基、
  - 6) 置換基を有していても良いC<sub>7-10</sub>アラルキル基、
  - 7) 置換基を有していても良いC<sub>3-8</sub>シクロアルキル基、
  - 8) 置換基を有していても良いC<sub>4-9</sub>シクロアルキルアルキル基、
  - 9) 置換基を有していても良い5ないし14員環ヘテロアラルキル基または
  - 10) 置換基を有していても良い5ないし14員環非芳香族複素環式基を表す]
5. R<sup>2</sup>が下記式(VI)で表される1に記載の検定方法。

式(VI)



[式中、n<sub>3</sub>は1または2の整数、

R<sup>cn1</sup>は



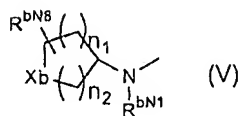
7) ピペリジン-1-イル基、

8) モルホリン-4-イル基または

9) 4-メチルピペラジン-1-イル基を表す]

4.  $R^2$ が下記式(V)で表される1に記載の検定方法。

式(V)



(式中、 $n_1$ 及び $n_2$ は同一または異なって、0ないし4の整数、

$X_b$ は

- 1)  $-CHR^{bN4}-$ 、
- 2)  $-NR^{bN5}-$ または
- 3)  $-O-$ 、

$R^{bN1}$ は

- 1) 水素原子または
- 2)  $C_{1-6}$ アルキル基、

$R^{bN6}$ は

- 1) 水素原子、
- 2)  $C_{1-6}$ アルキル基、
- 3)  $C_{6-14}$ アリール基または
- 4)  $C_{7-10}$ アラルキル基、

$R^{bN4}$ は

- 1) 水素原子、
- 2) 置換基を有していても良い $C_{1-6}$ アルキル基、
- 3) 置換基を有していても良い不飽和 $C_{2-10}$ アルキル基、
- 4) 置換基を有していても良い $C_{1-6}$ アルコキシ基、

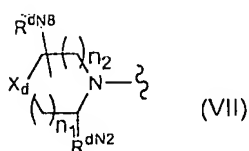
- 1) 水素原子または
- 2)  $C_{1-6}$  アルキル基、

$R^{dN5}$  は

- 1) 水素原子または
- 2)  $C_{1-6}$  アルキル基を表す]

6.  $R^2$  が下記式 (VII) で表される 1 に記載の検定方法。

式 (VII)



(式中、 $n_1$  及び  $n_2$  は同一または異なって、0 ないし 4 の整数、

$X_d$  は

- 1)  $-CHR^{dN4}-$ 、
- 2)  $-NR^{dN5}-$  または
- 3)  $-O-$ 、

$R^{dN2}$  は

- 1) 水素原子または
- 2)  $C_{1-6}$  アルキル基、

$R^{dN8}$  は

- 1) 水素原子、
- 2)  $C_{1-6}$  アルキル基、
- 3)  $C_{6-14}$  アリール基または
- 4)  $C_{7-10}$  アラルキル基、

$R^{dN4}$  は

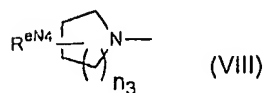
- 1) 水素原子、
- 2) 置換基を有していても良い  $C_{1-6}$  アルキル基、

- 3) 置換基を有していても良い不飽和C<sub>2-10</sub>アルキル基、
- 4) 置換基を有していても良いC<sub>1-6</sub>アルコキシ基、
- 5) 置換基を有していても良いC<sub>6-14</sub>アリール基、
- 6) 置換基を有していても良い5ないし14員環ヘテロアリール基、
- 7) 置換基を有していても良いC<sub>7-10</sub>アラルキル基、
- 8) 置換基を有していても良いC<sub>3-8</sub>シクロアルキル基、
- 9) 置換基を有していても良いC<sub>4-9</sub>シクロアルキルアルキル基、
- 10) 置換基を有していても良い5ないし14員環ヘテロアラルキル基、
- 11)  $-NR^{dN6}R^{dN7}$  (ここにおいて、 $R^{dN6}$ 及び $R^{dN7}$ は同一または異なって、水素原子またはC<sub>1-6</sub>アルキル基を表す) または

12) 置換基を有していても良い5ないし14員環非芳香族複素環式基、  
 $R^{dN5}$ は

- 1) 水素原子、
  - 2) 置換基を有していても良いC<sub>1-6</sub>アルキル基、
  - 3) 置換基を有していても良い不飽和C<sub>2-10</sub>アルキル基、
  - 4) 置換基を有していても良いC<sub>6-14</sub>アリール基、
  - 5) 置換基を有していても良い5ないし14員環ヘテロアリール基、
  - 6) 置換基を有していても良いC<sub>7-10</sub>アラルキル基、
  - 7) 置換基を有していても良いC<sub>3-8</sub>シクロアルキル基、
  - 8) 置換基を有していても良いC<sub>4-9</sub>シクロアルキルアルキル基、
  - 9) 置換基を有していても良い5ないし14員環ヘテロアラルキル基または
  - 10) 置換基を有していても良い5ないし14員環非芳香族複素環式基を表す]
7.  $R^2$ が下記式(VIII)で表される1に記載の検定方法。

式(VIII)



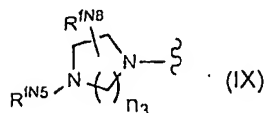
[式中、 $n_3$ は1ないし3の整数、

$R^{n4}$ は

- 1) アミノ基、
- 2)  $N-C_{1-6}$ アルキルアミノ基、
- 3) ピロリジン-1-イル基、
- 4) ピペリジン-1-イル基または
- 5) モルホリン-4-イル基を表す]

8.  $R^2$ が下記式 (IX) で表される1に記載の検定方法。

式 (IX)



[式中、 $n_3$ は1ないし3の整数、

$R^{n8}$ は

- 1) 水素原子、
- 2)  $C_{1-6}$ アルキル基、
- 3)  $C_{6-14}$ アリール基または
- 4)  $C_{7-10}$ アラルキル基、

$R^{n5}$ は

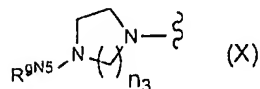
- 1) 水素原子、
- 2) 置換基を有していても良い $C_{1-6}$ アルキル基、
- 3) 置換基を有していても良い $C_{3-8}$ シクロアルキル基、
- 4) 置換基を有していても良い3ないし8員環非芳香族複素環式基、
- 5) 置換基を有していても良い $C_{6-14}$ アリール基、
- 6) 置換基を有していても良い5ないし14員環ヘテロアリール基、
- 7) 置換基を有していても良い $C_{7-10}$ アラルキル基、

8) 置換基を有していても良い5員環ないし14員環ヘテロアルキル基または

9) 置換基を有していても良いC<sub>4-9</sub>シクロアルキルアルキル基を表す]

9. R<sup>2</sup>が下記式(X)で表される1に記載の検定方法。

式(X)



[式中、n<sub>3</sub>は1ないし3の整数、

R<sup>NS</sup>は

- 1) 水素原子、
- 2) 置換されていてもよいC<sub>1-6</sub>アルキル基、
- 3) 置換されていてもよいC<sub>3-8</sub>シクロアルキル基、
- 4) 置換されていてもよいC<sub>4-9</sub>シクロアルキルアルキル基、
- 5) 置換されていてもよいC<sub>7-10</sub>アラルキル基、
- 6) 置換されていてもよいピリジル基または
- 7) 置換されていてもよいテトラヒドロピラニル基を表す]

10. 一般式(I)で表される化合物が下記化合物の何れか一つの化合物である、

1に記載の検定方法。

- 1) (8E, 12E, 14E)-7-アセトキシ-3, 6, 21-トリヒドロキシ-6, 10, 12, 16, 20-ペンタメチル-18, 19-エポキシトリコサー8, 12, 14-トリエン-11-オリド
- 2) (8E, 12E, 14E)-7-((4-シクロヘプチルピペラジン-1-イル)カルボニル)オキシ-3, 6, 16, 21-テトラヒドロキシ-6, 10, 12, 16, 20-ペンタメチル-18, 19-エポキシトリコサー8, 12, 14-トリエン-11-オリド、
- 3) (8E, 12E, 14E)-3, 6, 16, 21-テトラヒドロキシ-7-((4-イソプロピルピペラジン-1-イル)カルボニル)オキシ-6, 10, 12, 1

6, 20-ペンタメチル-18, 19-エポキシトリコサ-8, 12, 14-トリエン-11-オリド及び

4) (8E, 12E, 14E)-3, 6, 16, 21-テトラヒドロキシ-6, 10, 12, 16, 20-ペンタメチル-7-(4-メチルピペラジン-1-イル)カルボニル) オキシ-18, 19-エポキシトリコサ-8, 12, 14-トリエン-11-オリド

11. pRB の発現の減少、p16 の発現、または cyclin E の発現の増強を、それぞれをコードする mRNA 量を測定することにより検定する、1 に記載の検定方法。

12. mRNA 量を測定する方法が定量的 RT-PCR 法である、11 に記載の検定方法。

13. mRNA 量を測定する方法が DNA チップ法である、11 に記載の検定方法。

14. pRB の発現の減少、p16 の発現、または cyclin E の発現の増強を、それぞれの蛋白質量を測定することにより検定する、1 に記載の検定方法。

15. 蛋白質量を測定する方法がウエスタンブロット法である、14 に記載の検定方法。

16. 蛋白質量を測定する方法が免疫組織染色法である、14 に記載の検定方法。

17. 蛋白質量を測定する方法が ELISA 法である、14 に記載の検定方法。

18. pRB、p16 または cyclin E 遺伝子の連続した少なくとも 15 塩基の配列から成るプライマーを含んで成る、12 の検定方法に使用するキット。

19. pRB、p16 または cyclin E に対する抗体を含んで成る、15、16 または 17 に記載の検定方法に使用するキット。

癌細胞の pRB 低発現、p16 発現陽性または cyclin E 高発現という特徴を調べることにより、癌細胞の本化合物に対する感受性を予め予見することが可能となり、本化合物の抗腫瘍効果が期待できる癌患者のみに、本化合物を投与することが可能になった。治療効果を高め不要な副作用を軽減できることが期待された。

発明を実施するための最良の形態

本明細書中で pRB とは、Genbank Accession No. NM000321 に記載の塩基配列でコードされる分子量約 110KDa の蛋白質である。pRB をコードする RB 遺伝子は、網膜

芽細胞腫で変異を起こしている癌抑制遺伝子として単離され (Proc. Natl Acad. Sci. USA 84: 9059-9063, 1987)、その後種々の悪性細胞での変異が確認されている。

p16 とは、Genbank Accession No. HM000077 に記載の塩基配列でコードされる分子量約 16KDa の蛋白質である。p16 は、CDK4 及び CDK6 と結合し、CDK4/6 による pRB のリン酸化を抑制して pRB 活性保持に寄与している (Science 264: 436-440, 1994)。

cyclin E とは、Genbank Accession No. M74093 に記載の塩基配列でコードされる分子量約 52KDa の蛋白質である。細胞周期の G1/S 移行時に一過的に発現量が上昇することで細胞周期進行に中心的役割を果たしているが、癌化に伴って発現量の絶対量の上昇及び一過的上昇のパターンの破綻が報告されている (Int. J Cancer 104: 369-75, 2003)。

また、p16 と pRB の発現量の逆相関関係は多くの癌種において報告されていることから、p16 の発現陽性と pRB の低発現は同一の事象に起因していると考えられる (EMBO J. 14: 503-511, 1995)。

本化合物は、WO 02/060890、WO 03/099813 及び WO 04/011661 に記載の方法により製造できる。また、本化合物が抗癌活性を有していることは、WO 02/060890、WO 03/099813 及び WO 04/011661 に記載されている。

本発明は、癌細胞の pRB 低発現、p16 発現陽性または cyclin E 高発現という特徴を調べることにより、本化合物に対する感受性を検定する方法であり、癌細胞は癌組織から採取した細胞であっても、in vitro で培養された細胞であっても許されるが、好ましくは、生検により癌組織から取り出された癌組織の細胞であることが望ましく、更に好ましくは、その癌組織は癌の診断に際して生検により取り出された癌組織であることが望ましい。

本発明の方法により、高感受性と判断された癌細胞が採取された患者に対して、本化合物を投与することにより、本化合物の抗腫瘍効果が期待できる癌患者を選別して、本化合物を投与することが可能なる。これにより、治療効果を高め不要な副作用を軽減できることが期待される。

本発明における癌細胞の pRB 低発現、p16 発現陽性または cyclin E 高発現という特徴を調べる方法としては、転写された mRNA の量を測定しても、または翻訳され

た蛋白質の量を測定しても良い。mRNA 量を測定する方法としては、RT-PCR 法・DNA チップ法などが挙げられ、蛋白質量を測定する方法としては、ウエスタンブロット法・免疫組織染色法・ELISA 法などが挙げられるが、発現量を測定する方法であれば良く、本発明がこれらの例に限定されるものではない。

また、突然変異によりこれら蛋白質が変異し (pRB の変異に関しては次の報告がある : Proc Natl Acad Sci U S A 87: 6922-6, 1990; Proc Natl Acad Sci U S A 87: 6-10, 1990) 発現が減少しているのと実質的に同等であることを、該 DNA・mRNA の塩基配列や電気泳動度より解析して変異 DNA・mRNA を検出した場合 (Oncogene 8: 1913-9, 1993)、または変異を識別できる抗体若しくは電気泳動度により変異蛋白質を検出した場合も、本発明に含まれる。

以下に、採取した腫瘍組織から pRB、p16、cyclin E の発現を測定する方法について詳しく説明するが、培養細胞からも同様の方法により発現を測定できるが、本発明はこれに限られない。

なお、本明細書において引用した文献、及び公開公報、特許公報その他の特許文献は、参照として本明細書に組み込むものとする。

#### 1. RT-PCR 法 :

採取した腫瘍組織から常法 (実験医学増刊「PCR とその応用」8: 1063-1071, 1990) により mRNA を調製する。調製した mRNA を鋳型にして、RT-PCR により pRB・p16・cyclin E の発現量を測定することができる。RT-PCR は、例えば Real Time RT-PCR Core Kit (TaKaRa Code PR032A) を用いて、逆転写反応とそれに引き続く PCR 反応 (RT-PCR) を行うことが可能である。

mRNA を定量して発現量を測定するために、RT-PCR は定量的な RT-PCR であることが好ましい。定量的な RT-PCR としては、様々な方法が報告されているが (Genome Res. 6: 986-994, 1996)、好ましくは同じプライマーにより増幅される既知量の競合鋳型 RNA を共存させて RT-PCR を行い、両増幅産物の量を比較して定量を行う競合 RT-PCR が望ましい。

上記 Genbank Accession No. に記載の配列情報を基に pRB・p16・cyclin E をコードする mRNA (標的 mRNA と称す) を検出するためのプライマーを作製する。また定



量のため、そのプライマーと相補的な配列を有するが、分子量または制限酵素切断部位が標的 mRNA とは異なる競合鋳型 RNA を作製する。変異が高発する部位 (pRB に関しては、Proc Natl Acad Sci U S A 87: 6922-6, 1990; Proc Natl Acad Sci U S A 87: 6-10, 1990 に報告) にプライマーを設定することにより、変異蛋白質のみを、または正常蛋白質のみを定量することができる。

腫瘍組織から調製した mRNA 試料に、既知量の競合鋳型 RNA を希釈したものを加え、プライマーを加えて RT-PCR を行う。生成した増幅産物の分子量または制限酵素消化後の分子量により、生成増幅産物が標的 mRNA 由来であるか競合鋳型 RNA 由来であるかを区別し、両増幅産物の量比、及び添加した競合鋳型 RNA の量から標的 mRNA の定量値を計算する。mRNA 量は普遍的に発現が認められるアクチン mRNA、18S rRNA 等と比較した相対量として測定することも許される。高感受性及び低感受性の癌細胞の pRB・p16・cyclin E の mRNA 量を測定してカットオフ値を決め、カットオフ値との比較で高発現であるか低発現であるかを判断する。

また、標準細胞とは電気泳動度の異なるバンドが現れた場合、または変異蛋白質が検出された場合は、低発現であると判断する。

pRB 低発現、p16 発現陽性または cyclinE 高発現の場合に、好ましくは pRB 低発現かつ cyclinE 高発現の場合、または p16 発現陽性かつ cyclinE 高発現の場合に、該癌細胞が本化合物に対して高感受性であると判断する。

## 2. DNA チップ法:

採取した腫瘍組織から、例えば常法(実験医学増刊「PCR とその応用」8: 1063-1071, 1990)により mRNA を抽出して、逆転写反応によって蛍光標識し、合成された標識 cDNA を癌関連遺伝子の Oligonucleotide がスポットしてあるマイクロアレイ IntelliGene Human Cancer CHIP Ver. 4.0 (タカラバイオ株式会社 X102) 上にハイブリダイズする (Nature genetics supplement 21; 10-14; 1999)。

その際、腫瘍組織サンプルと正常組織サンプルを別々の蛍光色素で、例えば Cy3 (赤) と Cy5 (緑) に標識することによって、どちらのサンプルで遺伝子が増えているかを判定する。コンピュータ解析ソフトにより、正常組織から得られた標識 cDNA をハイブリダイズした場合と比較して癌組織の方が多ければ例えば赤、同等な

らば例えば黄、少なければ例えば緑として画像表示させることができる。このシグナルの強弱をコンピューター解析ソフトで数値化することで、両者における遺伝子発現比 (Cy3=癌組織/Cy5=正常組織) のデーターを算出し、これらの発現比が2倍以上または1/2以下を、好ましくは3倍以上または1/3以下を有意として判定する。

pRB が緑、p16 が黄若しくは赤、または cyclinE が赤の場合に、該癌細胞が本化合物に対して高感受性であると判断する。好ましくは pRB が緑かつ cyclinE が赤の場合、または p16 が黄若しくは赤かつ cyclinE が赤の場合に、該癌細胞が本化合物に対して高感受性であると判断する。

### 3. ウェスタンブロット法:

以下のウェスタンブロット法、免疫組織染色法及び ELISA 法に用いる抗 pRB 抗体・抗 p16 抗体・抗 cyclin E 抗体は、市販の抗体を用いることができる。抗 pRB 抗体は、例えば Cell Signaling 社から Rb Antibody (カタログ No. : 9302) を、抗 p16 抗体は、例えば Santa Cruz 社から p16 (C-20) (カタログ No. : sc-468) を、抗 cyclin E 抗体は、例えば BD PharMingen 社から Purified anti-human Cyclin E (カタログ No. : 554182) を入手できる。

また、抗体は上記 Genbank Accession No. に記載の情報を基に作製された抗原を免疫して作製することも可能である。抗原は、上記 Genbank Accession No. に記載の配列情報を基に pRB・p16・cyclin E 発現ベクターを作製し、該ベクターを導入した発現細胞から pRB・p16・cyclin E 蛋白を精製して得ることができる。これら蛋白質は精製が容易となるよう、融合蛋白質として発現させることが好ましい。また別法として、上記 Genbank Accession No. に記載の配列情報を基にペプチドを合成し、キャリアー蛋白質と結合させて抗原とすることもできる。それら抗原を動物に免疫し、得られた血清から抗体を精製するか、または得られた抗体産生細胞からハイブリドーマを作製して、その培養液から抗体を精製することができる。

また、pRB・p16・cyclin E、特に pRB の変異を検出するために、例えば、Proc Natl Acad Sci U S A 87: 6922-6, 1990; Proc Natl Acad Sci U S A 87: 6-10, 1990 に記載の変異を有する変異蛋白質を発現させ、または変異部位を含むペプチドを合

pRB 抗体や抗 cyclin E 抗体、または抗 p16 抗体を反応させた後、アビジン-ビオチン-酵素抗体法にて染色する (J. Histochem. Cytochem. 27; 1131-1139, 1979)。染色した組織標本中の腫瘍組織の pRB・p16・cyclinE の染色度を正常組織と比較して、pRB 低発現、p16 発現陽性あるいは cyclinE 高発現を判断する。変異蛋白質が検出された場合は、低発現であると判断する。

.. pRB 低発現、p16 発現陽性または cyclinE 高発現の場合に、好ましくは pRB 低発現かつ cyclinE 高発現の場合、または p16 発現陽性かつ cyclinE 高発現の場合に、該癌細胞が本化合物に対して高感受性であると判断する。

## 5. ELISA 法

ELISA 法は Ed Harlow ら (Antibodies A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory) に記載の方法により行うことができるが、具体的には例えば以下の通り行うことができる。

採取した腫瘍組織より、pRB・p16・cyclinE を含む画分を調整する。具体的には例えば、腫瘍組織を細胞調製液 (好ましくは各種プロテアーゼ阻害剤及び 10% グリセロールを含む) を用いてホモゲナイズし、そこに 1% NP-40 を添加して可溶画分と残渣を得る。可溶画分をそのまま ELISA 法に用いるか、もしくは残渣画分を 0.5 M の NaCl を加え抽出操作を行った後、NaCl 濃度を 0.1~0.15 M に下げってから ELISA 法に用いる。

可溶画分及び NaCl 抽出画分を、抗 pRB 抗体、抗 p16 抗体、または抗 cyclin E 抗体がコートされている 96 穴プレートに添加し抗体と反応させる。コートされた抗体に結合した pRB、p16、または cyclin E を、それぞれに対する酵素標識抗体でサンドイッチし、結合した酵素の活性を測定することにより腫瘍組織で発現している pRB、p16、または cyclin E を定量する。

高感受性及び低感受性の癌細胞の pRB・p16・cyclin E の量を測定してカットオフ値を決め、カットオフ値との比較で高発現であるか低発現であるかを判断する。

pRB 低発現、p16 発現陽性または cyclinE 高発現の場合に、好ましくは pRB 低発現かつ cyclinE 高発現の場合、または p16 発現陽性かつ cyclinE が高発現の場合に、該癌細胞が本化合物に対して高感受性であると判断する。

成して、それを動物に免疫し、変異蛋白質に特異的に反応する抗体を得ることができる。または逆に、正常蛋白質を免疫して、正常蛋白質は反応するが変異蛋白質には反応しない抗体も作製可能である。抗体の作製法は *Methods in Enzymology* 182, p663-679 に記載されている。

採取した腫瘍組織より、pRB・p16・cyclin Eを含む SDS-PAGE 用サンプルを調整する。具体的には例えば、腫瘍組織を細胞調製液（好ましくは各種プロテアーゼ阻害剤及び 10%グリセロールを含む）を用いてホモゲナイズし、等量の SDS-PAGE 用サンプルバッファーを混合し 97℃で 5 分の熱処理を行って、SDS-PAGE 用サンプルとする。ウエスタンブロット法は、*Methods in Enzymology* 182, 679-688 に記載の方法により行うことができるが、具体的には例えば以下の通り行うことができる。

各サンプル一定量を SDS-PAGE にて分画後、Hybond ECL 膜にトランスファーし、抗 pRB 抗体・抗 p16 抗体・抗 cyclin E 抗体を反応させた後、酵素標識した二次抗体を反応させ、酵素活性により Hybond ECL 膜にトランスファーされた pRB・cyclin E・p16 を検出する。好ましくは対照として、pRB・p16・cyclin E の発現が認められる標準細胞、好ましくは全ての発現が認められる MDA-MB435 細胞等を同時にアプラインして、MDA-MB435 細胞での発現と比較して、高発現であるか低発現であるかを判断する。

また、標準細胞とは電気泳動度の異なるバンドが現れた場合、または変異蛋白質が検出された場合は、低発現であると判断する。

\*pRB 低発現、p16 発現陽性または cyclinE 高発現の場合に、好ましくは pRB 低発現かつ cyclinE 高発現の場合、または p16 発現陽性かつ cyclinE 高発現の場合に、該癌細胞が本化合物に対して高感受性であると判断する。

#### 4. 免疫組織染色法

免疫組織染色法は、例えば実験医学別冊（ポストゲノム時代の免疫染色、*in situ* ハイブリダイゼーション、1997）に記載の方法により行うことができるが、具体的には例えば以下の通り行うことができる。

採取した腫瘍組織に埋包剤を浸透させてブロックを作製した後、2~8 $\mu$ m の厚さにスライスしてスライドガラスに貼り付けて組織標本を作製する。組織標本に、抗

#### 図面の簡単な説明

図 1 は、各ヒト癌細胞株における pRB・cyclin E・p16・cyclin D1 のウエスタンブロットによる発現量解析結果である。

図 2 は、SY-1 株及び H-526 株、H-460 株における pRB・p16・cyclin E の免疫組織染色による発現量解析結果である。

図 3 は、子宮体癌の臨床標本における p16・cyclin E の免疫組織染色による発現量解析結果である。

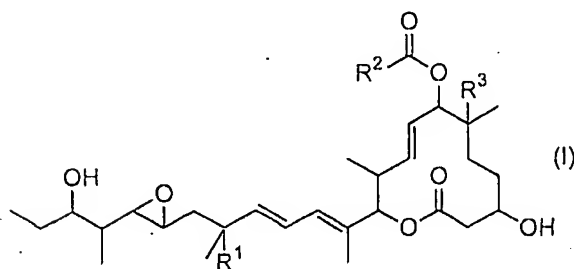
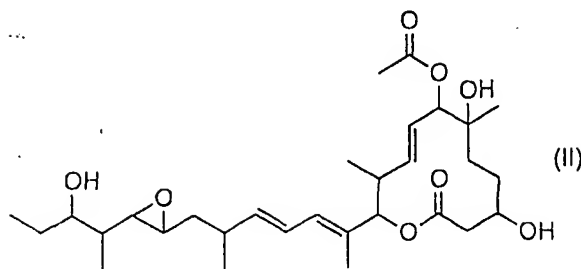
図 4 は、p16 mRNA 量と T/C%、p16 mRNA 量と p16 蛋白の発現量の関連を示したグラフである。

#### 実施例

以下に、本発明の有用性を示すための例を示すが、これらは例示的なものであって、本発明は如何なる場合にも以下の具体例に制限されるものではない。

〔実施例 1〕 BSY-1 株及び WiDr 株を含むヒト癌細胞株 25 株における細胞周期関連分子群の発現解析

WO 02/060890 において、下記式 II で表される (8 E, 12 E, 14 E) - 7 - アセトキシ - 3, 6, 21 - トリヒドロキシ - 6, 10, 12, 16, 20 - ペンタメチル - 18, 19 - エポキシトリコサ - 8, 12, 14 - トリエン - 11 - オリド (以下、化合物 1 と称す) に対して強い感受性を示した BSY-1 株、及び WO 03/099813 において一般式 I で表される化合物のうち R1 が水酸基である化合物群に対して感受性を示した WiDr 株を含む、ヒト癌細胞株 25 株における細胞周期関連分子群 pRB・p16・cyclin E・cyclin D1 の発現をウエスタンブロット法にて解析した。



25 株のヒト癌細胞株をヌードマウスの体側皮下に移植し、腫瘍体積が 100mm<sup>3</sup> 以上になった時点で腫瘍を摘出、各種プロテアーゼ阻害剤 (Leupeptin, p-APMSF, EDTA, o-NaVO<sub>4</sub>) 及び 10%グリセロール含有の細胞調製液を用いてホモゲナイズした。その際、腫瘍サンプル重量あたりの細胞調製液量を一定にした。それぞれの細胞調製液に、等量の SDS-PAGE 用サンプルバッファーを混合し、97℃で 5 分の熱処理を行って、SDS-PAGE 用サンプルとした。各 SDS-PAGE 用サンプルの一定量を SDS-PAGE にて分離し、Hybond ECL 膜にトランスファーした後、pRB・cyclin E・p16・cyclin D1 に対する抗体を反応させた。その後 HRP 標識の二次抗体を反応させ化学発光基質 (Super Signal; PIERCE 社) を加えて、イメージマスター VDS-CL (Amersham Pharmacia) を用いて pRB・cyclin E・p16・cyclin D1 の band を検出した。

各癌細胞株における pRB・p16・cyclin E・cyclin D1 の発現量を相対的に比較するための対照として、全分子の発現が認められる MDA-MB435 細胞をすべての SDS-PAGE にアプライして同様に検出した。

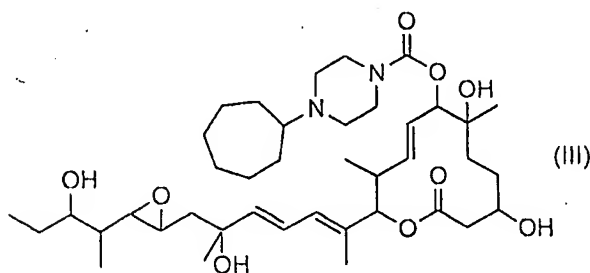
その結果を図 1 に示した。強い感受性を示す BSY-1 株に pRB の欠失、p16 の発現、cyclin E の高発現という性質が有ることから、これら性質が、in vivo での本化合物への感受性に関連するか否かについて検討を行った。

図1において、A～Z、E、A1～E1およびEの各符号は、各々下記のヒト癌細胞株を示す。

A: BSY-1 (breast)	K: FaDu (head & neck)	U: DLD-1 (colorectal)
B: MDA-MB-468 (breast)	L: LC-6-JCK (NSCLC)	V: PC-3 (prostate)
C: HBC-4 (breast)	M: Lu99 (NSCLC)	W: NCI-H510A (SCLC)
D: KPL-4 (breast)	N: NCI-H460 (NSCLC)	X: NCI-H522 (SCLC)
E: MDA-MB-435 (breast)	O: NCI-H596 (NSCLC)	Y: WiDr (colorectal)
F: NCI-H146 (SCLC)	P: Calu-1 (NSCLC)	Z: DU145 (prostate)
G: NCI-H69 (SCLC)	Q: PC14 (NSCLC)	A1: DMS114 (NSCLC)
H: NCI-H526 (SCLC)	R: HT-29 (colorectal)	B1: Colo320DM (colorectal)
I: NIH:OVCA-3 (ovarian)	S: SW620 (colorectal)	C1: CQL-3 (colorectal)
J: SK-OV-3 (ovarian)	T: KM12 (colorectal)	D1: LoVo (colorectal)
		E1: MKN45 (stomach)

〔実施例2〕 pRB・p16・cyclin E・cyclin D1 の発現と本化合物への感受性の相関

実施例1で pRB・p16・cyclin E・cyclin D1 の発現を調べた 25 株のヒト癌細胞株について、代表的な本化合物、下記式 III で示される〔(8E, 12E, 14E) - 7 - ( (4-シクロヘプチルピペラジーン-1-イル) カルボニル) オキシ-3, 6, 16, 21-テトラヒドロキシ-6, 10, 12, 16, 20-ペンタメチル-1, 8, 19-エポキシトリコサ-8, 12, 14-トリエン-11-オリド〕(以下、化合物2と称す) に対する感受性を調べた。



培養フラスコ、またはヌードマウスの皮下において増殖させた 25 種類のヒト癌細胞を、ヌードマウスの体側皮下に移植し、腫瘍体積が 100 mm<sup>3</sup> 以上になった時点で各群の腫瘍体積の平均が均一になるように群分けをし、対照群 5 匹、化合物2投与群 5 匹とした。投与群には 10mg/kg/day となるように 5 日間静注し、対照群は無

処理または媒体投与とした。投与開始日 (Day1) から Day5, 8, 12, 15 と以下経時的に腫瘍体積を測定し、相対的な腫瘍体積比 (T/C%) を求めた。

pRB・p16・cyclin E・cyclin D1 の発現と化合物 2 への感受性の相関を、表 1 に示した。実施例 1 で解析したヒト癌細胞株における pRB・cyclin E・p16・cyclin D1 の発現量を相対的に評価し、発現が認められないものを－、発現量が認められるものをその強度に応じて＋～++++と表記して、腫瘍体積比 (T/C%) の結果と並べて示した。また、pRB に関しては、変異型 pRB の発現が報告されている小細胞肺癌株・卵巣癌株・前立腺癌株 (Oncogene 9, 3375-3378, 1994; Prostate 21, 145-52, 1992; Exp Cell Res, 233, 233-9, 1997) に ( ) を付して記載した。

表 1

pRB・cyclin E・p16・cyclin D1 発現量と、  
化合物 2 に対する感受性

細胞株	pRB	p16	cyclin E	cyclin D1	T/C%
BSY-1	－	++	+++	+++	0
MDA-MB468	－	+	+++	++	0
LC-6-JCK	－	++	+++	+	0
OVCAR3	(+)	++	+++	++	0
NCI-H146	(±)	++	+++	±	1
NCI-H69	(++)	++	±	±	1
NCI-H526	(+)	++	+	±	1
PC-3	++	－	++	+++	2
FaDu	+	－	±	+++	3
WiDr	+	－	+++	+++	4
HBC4	－	－	++	++	5
Lu99	+++	－	±	±	8
NCI-H510	(+)	++	+	±	10
NCI-H596	－	++	+++	+	18
KPL-4	+	－	+	+++	23
SK-OV-3	+++	－	++	+++	27
DU145	－	－	+++	++	28
MDA-MB435	+++	+	++	+++	28
HT-29	+	－	+	±	28
SW620	+++	－	+	++	28
NCI-H460	+++	－	+	±	33
KM12	++	－	+	++	34
NCI-H522	+	－	+++	+++	42
DLD-1	++	－	+	+++	47
Calu-1	+	－	++	++	55



調べたヒト癌細胞株 25 株中、ウエスタンブロット法でバンドが検出されない（「-」で表示）、または文献情報で変異や欠失が報告されている（括弧付きで表示）癌細胞株 11 株が pRB 低発現に分類され、このうちの 7 株（64%）が  $T/C\% \leq 1\%$  であった。これに対し pRB を発現している 14 株には  $T/C\% \leq 1\%$  となる癌細胞株は無く（ $p=0.0006$ ）、pRB 低発現により化合物 2 に対する感受性を検定できることが明らかとなった。

また p16 発現陽性の癌細胞 10 株中 7 株（70%）が  $T/C\% \leq 1\%$  であるのに対し、p16 を発現していない 15 株には  $T/C\% \leq 1\%$  となる癌細胞株は無く（ $p=0.0002$ ）、pRB 低発現と同様、p16 発現陽性により化合物 2 に対する感受性の検定が可能であった。

調べた 25 の癌細胞株株の中で、11 株が pRB 低発現（ウエスタンブロット法で検出されなかったか文献情報で変異や欠失が報告されている）に分類され、このうちの 9 株で p16 は発現していた。逆に p16 を発現している 10 株中 9 株が pRB 低発現であり、報告されている通り（EMBO J. 14: 503-511, 1995）、p16 発現陽性の癌細胞は pRB 低発現の癌細胞とほぼ一致していた。

cyclin E 高発現については、高発現（+++）している 9 株中 5 株（56%）が  $T/C\% \leq 1\%$  であるのに対し、高発現していない癌細胞では 16 株中 2 株（13%）が  $T/C\% \leq 1\%$  と、cyclin E 高発現の癌細胞は明らかに感受性が高かった（ $p=0.02$ ）。

完全な腫瘍の消失（ $T/C\%=0\%$ ）を見た 4 株、及び消失はしないまでも長期間にわたる腫瘍縮小の継続を示した NCI-H146 を合わせた 5 株に対する化合物 2 の効果は、治癒的効果と考えられ、これら全ての株は pRB 低発現・p16 発現・cyclin E 高発現という性質を示した。

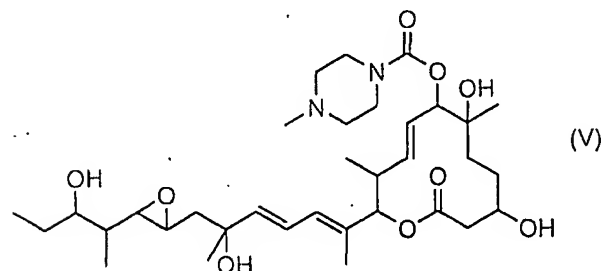
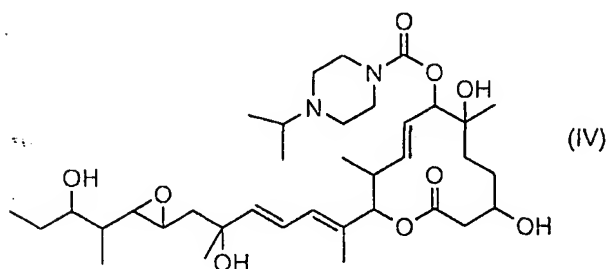
そこで、pRB 低発現・cyclin E 高発現の 2 つの性質と、化合物 2 の治癒的効果の相関を見てみると、両方の性質を持つ癌細胞 7 株中 5 株（71%）で治癒的効果を示したのに対し、それ以外の癌細胞株 18 株中には治癒的効果を示した癌細胞株は見出されなかった（ $p=0.0001$ ）。また、p16 発現陽性・cyclin E 高発現の両方の性質を持つ癌細胞では、両方の性質を持つ癌細胞 6 株中 5 株（83%）で治癒的効果を示し、それ以外の癌細胞株 19 株中には治癒的効果を示した癌細胞株は見出されなかった（ $p=0.00002$ ）。cyclin E 高発現は、pRB 低発現または p16 発現陽性の指標と

組み合わせることにより、更に有用な指標となった。

これらの結果より、pRB 低発現・p16 発現・cyclin E 高発現の性質を調べることにより、癌細胞株の化合物 2 に対する感受性が予見できることが明らかとなった。

〔実施例 3〕 代表的な 3 化合物に対する癌細胞株の感受性検定

WO 02/060890 において BSY-1 株に対して高い抗腫瘍活性を示した化合物 1、及び WO 03/099813 において WiDr 株に対して抗腫瘍活性を示した一般式 I で表される本化合物のうち代表的な化合物 (8E, 12E, 14E) - 3, 6, 16, 21-テトラヒドロキシ-7-((4-イソプロピルピペラジニン-1-イル)カルボニル)オキシ-6, 10, 12, 16, 20-ペンタメチル-18, 19-エポキシトリコサー-8, 12, 14-トリエン-11-オリド(下記式 IV、以下化合物 3 と称す)、及び (8E, 12E, 14E) - 3, 6, 16, 21-テトラヒドロキシ-6, 10, 12, 16, 20-ペンタメチル-7-((4-メチルピペラジニン-1-イル)カルボニル)オキシ-18, 19-エポキシトリコサー-8, 12, 14-トリエン-11-オリド(下記式 V、以下化合物 4 と称す)について、ヒト癌細胞株の pRB 低発現・p16 発現・cyclin E 高発現の性質と、感受性の相関について調べた。



培養フラスコ、またはヌードマウスの皮下において増殖させた癌細胞を、ヌード

マウスの体側皮下に移植し、腫瘍体積が 100 mm<sup>3</sup> 以上になった時点で各群の腫瘍体積の平均が均一になるように群分けをし、対照群 5 匹、化合物投与群 5 匹とした。投与群には 10mg/kg/day となるように 5 日間静注し、対照群は無処理または媒体投与とした。投与開始日 (Day1) から Day5, 8, 12, 15 と以下経時的に腫瘍体積を測定し、相対的な腫瘍体積比 (T/C%) を求めた。但し、化合物 1 の評価の際は原則として Day15 までで実験を終了した。表 2 には、各癌細胞に対する化合物 1, 2, 4、及び実施例 2 の化合物 2 の T/C% を示した。

表 2 に示す通り、化合物 1 の T/C% が多少大きな値を示すものの試験した化合物全てで抗腫瘍効果が認められ、各種ヒト癌細胞株のこれら化合物に対する感受性は同じ傾向を示した。化合物 1, 3, 4 で化合物 2 との T/C% の相関を求めたところ、それぞれ 0.724、0.948、0.923 と高い相関を示した。このことから、一般式 I で表される化合物間において、各種癌細胞株の感受性が共通していることが示された。

表 2

化合物 2 と化合物 1, 3, 4 の抗腫瘍効果の相関

細胞株	腫瘍体積比 (T/C%)			
	化合物 2	化合物 1	化合物 3	化合物 4
BSY-1	0	0	2	N.D.
LC-6-JCK	0	N.D.	0	N.D.
OVCAR3	0	23	N.D.	N.D.
PC-3	2	20	4	3
FaDu	3	33	1	5
WiDr	4	29	4	7
NCI-H596	18	76	N.D.	N.D.
DU145	28	26	34	26
MDA-MB435	28	50	N.D.	N.D.
HT-29	28	58	26	46
SW620	28	N.D.	19	N.D.
NCI-H460	33	53	N.D.	N.D.
NCI-H522	42	64	N.D.	N.D.
DLD-1	47	59	N.D.	N.D.

〔実施例 4〕 BSY-1 株及び H-526 株、H-460 株における pRB・p16・cyclin E 発現の免疫組織染色による解析

化合物 2 に対して治癒するまでの強い感受性を示した BSY-1 株、及び治癒には至らないまでも強い感受性を示した H526 株、更には感受性が低かった H460 株において、細胞周期関連分子群 pRB・p16・cyclin E の発現を免疫組織染色法にて解析した。

上記 3 株のヒト癌細胞株をヌードマウスの体側皮下に移植し、腫瘍体積が 100 mm<sup>3</sup> 以上になった時点で腫瘍を摘出して、中和した 10%ホルマリンにて 1 日間固定してパラフィン包埋ブロックを作製した。パラフィンブロックを 4 μm の厚さにスライスしてスライドグラスに貼り付けたものを、免疫組織染色用標本とした。免疫組織染色用標本は、脱パラフィン操作、恒温槽を用いた熱処理で抗原賦活化、内在性ペルオキシダーゼのブロッキングなどの操作を施した後に、pRB・p16・cyclin E に対する一次抗体と室温で 1 時間反応させた。ペルオキシダーゼ標識した抗マウスあるいは抗ウサギ二次抗体を反応させて、DAB を発色基質としてそのペルオキシダーゼ活性を可視化して顕微鏡下観察した。

その結果を図 2 示した。ウエスタンブロット法で示された結果と同様の結果が、免疫組織染色においても得られることが明らかとなった。この結果から、臨床において繁用されるパラフィン包埋ブロックの標本を用いても、細胞周期関連分子群 pRB・p16・cyclin E の発現解析が行える可能性が示された。

〔実施例 5〕 臨床標本における p16・cyclin E 発現の免疫組織染色による解析

SuperBioChips Laboratories 社より購入したパラフィン包埋の臨床標本（正常組織 12、癌組織 12）を用いて、免疫組織染色法による細胞周期関連分子群 p16・cyclin E の発現解析を行った。

臨床パラフィン包埋標本を、実施例 4 と同様に p16・cyclin E に対する抗体で免疫組織染色を行った。その結果、正常組織において、p16・cyclin E の過剰発現は観察されなかったのに対し、一部の癌組織において p16（12 例中 3 例）、cyclin E（12 例中 1 例）の過剰発現が観察された。図 3 には、p16・cyclin E の両分子が過剰発現していた子宮体癌の染色結果を示した。この結果から、臨床パラフィン包埋

ブロックの標本を用いても、細胞周期関連分子群 p16 及び cyclin E が過剰発現している癌組織を選別出来る可能性が示された。

[実施例 6] 臨床標本における p16・cyclin E 発現の免疫組織染色 - 2

実施例 5 に加え、更に多数の癌種（胃癌・食道癌・肺癌・大腸癌・甲状腺癌・腎癌・乳癌・肝癌・膀胱癌・卵巣癌・膵癌・前立腺癌・子宮内膜癌・胆嚢癌・喉頭癌・子宮頸癌・悪性リンパ腫・悪性メラノーマ、各 10 サンプルの合計 180 サンプル）についてパラフィン包埋した臨床腫瘍標本を SuperBioChips Laboratories 社より購入し、実施例 4、5 と同様に、免疫組織染色法による細胞周期関連分子群 p16・cyclin E の発現解析を行った。

臨床パラフィン包埋標本を、実施例 4、5 と同様に、p16, cyclin E に対する抗体で免疫組織染色を行ったところ、表 2 に示したとおり、「p16 及び cyclin E の過剰発現」の特徴が、子宮頸癌において 10 例中全例で観察されたのを筆頭に、卵巣癌で 10 例中 4 例、乳癌で 10 例中 3 例において認められた。臨床パラフィン包埋ブロックの標本を用いた「p16 及び cyclin E の過剰発現」の癌組織を選別出来る可能性が確認されると共に、癌種によっては高率で「p16 及び cyclin E の過剰発現」の特徴を持っている可能性があることが示された。

表 3

各癌種標本における「p16及びcyclin Eの過剰発現」の出現頻度

癌種	過剰発現の頻度	癌種	過剰発現の頻度
胃癌	1/10	卵巣癌	4/10
食道癌	1/10	膵癌	1/10
肺癌	0/10	前立腺癌	0/8 *
大腸癌	1/10	子宮内膜癌	1/10
甲状腺癌	0/10	胆嚢癌	1/10
腎癌	0/9 *	喉頭癌	1/10
乳癌	3/10	子宮頸癌	10/10
肝癌	0/10	悪性リンパ腫	0/10
膀胱癌	2/9 *	悪性メラノーマ	2/9 *

\* : 評価不能サンプル(癌細胞の含有なし、スライドグラスからの剥離等)を除外したため、10例に満たない。

## [実施例 7] RT-PCR による p16 過剰発現の検出

28 株のヒト癌細胞株をヌードマウスの体側皮下に移植し、腫瘍体積が  $100 \text{ mm}^3$  以上になった時点で腫瘍を摘出し、各癌種につき 3 例の腫瘍をプールした。それらの腫瘍を液体窒素で凍結後、TRIzol 試薬 (SIGMA 社) を用いて全 RNA を抽出し、RNeasy mini Kit (QIAGEN 社) を用いて精製した。Taqman<sup>(R)</sup> reverse transcription reagents (ABI 社) を用いて cDNA を合成後、プローブとして p16 の Taqman<sup>(R)</sup> gene expression assays (ABI 社) と反応試薬として Taqman<sup>(R)</sup> Gold RT-PCR reagents を用いて Sequence detection systems (7900HT, ABI 社) で各腫瘍の p16 mRNA 量を測定した。得られた数値を 18S rRNA の値で補正して p16 mRNA の相対的な量を求めた。

表 3 に、実施例 1 においてウエスタンブロット法により求めた p16 蛋白の発現量を求め、実施例 2 において抗腫瘍効果 T/C% を求めたヒト癌細胞株について、p16 mRNA の相対的な量をまとめて示した。また、図 4 に p16 mRNA 量と T/C%、p16 mRNA 量と p16 蛋白の発現量の関連をグラフに示した。

表 3 及び図 4 に示す通り、p16 mRNA の相対量が 0.3 以上の高発現癌細胞 12 株中 6 株 (50%) で、 $T/C\% \leq 1\%$  であるのに対し、0.3 未満の 13 株中では  $T/C\% \leq 1\%$  となる癌細胞株は 1 株しか存在しなかった ( $p=0.02$ )。p16 mRNA 量の測定により、「p16 過剰発現」の癌をスクリーニングし、化合物 2 に対する感受性を検定することが可能であることが明らかとなった。

また表 3 及び図 4 に示す通り、p16 蛋白の発現量と p16 mRNA 量の間には相関が認められ、p16 蛋白の過剰発現 (++) を認めた 8 株における p16 の相対的 mRNA 量が  $0.5786 \pm 0.3259$  であるのに対し、p16 蛋白発現 (+) の 2 株では  $0.3610$ 、p16 蛋白が認められなかった 15 株では  $0.2073 \pm 0.2424$  であった。RT-PCR 等の p16 mRNA を検出する方法によっても、p16 蛋白発現を検出する方法と同様な結果を得ることができると考えられる。

表 4

## p16のmRNA量と蛋白発現量との関係

細胞株	p16 mRNA 相対量	p16蛋白発現	T/C%
BSY-1	1.2065	++	0
MDA-MB468	0.1503	+	0
LC-6-JCK	0.6046	++	0
OVCAR-3	0.9336	++	0
NCI-H146	0.4642	++	1
NCI-H69	0.3556	++	1
NCI-H526	0.3372	++	1
PC-3	0.5174	—	2
FaDu	0.0060	—	3
WiDr	0.2110	—	4
HBC4	0.0377	—	5
Lu99	0.0000	—	8
NCI-H510	0.4302	++	10
NCI-H596	0.2971	++	18
KPL-4	0.2822	—	23
SK-OV-3	0.0000	—	27
DU145	0.6043	—	28
MDA-MB435	0.5716	+	28
HT-29	0.2137	—	28
SW620	0.3177	—	28
NCH-H460	0.0001	—	33
KM12	0.3392	—	34
NCI-H522	0.0001	—	42
DLD-1	0.0000	—	47
Calu-1	0.1499	—	55

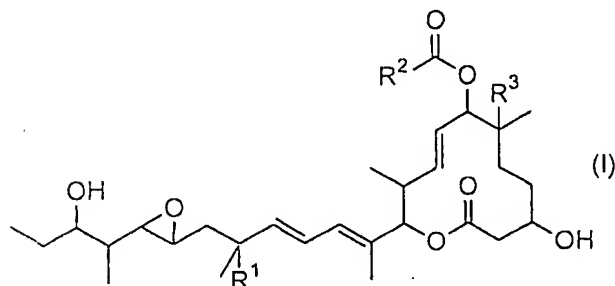
## 産業上の利用可能性

pRB 低発現、p16 発現陽性または cyclin E 高発現の特徴を調べることにより、本化合物に対する癌細胞の感受性を調べ、本化合物の抗腫瘍効果が期待できる癌患者のみに本化合物を投与すれば、治療効果を高め不要な副作用を軽減することが可能である。

## 請求の範囲

1. 1)pRB の発現が減少している、
  - 2)p16 が発現している、
  - 3)cyclin E の発現が増強している、
  - 4)pRB の発現が減少しかつ cyclin E の発現が増強している、または
  - 5)p16 が発現しかつ cyclin E の発現が増強している、の何れか一つを指標とする、
- 下記一般式 I で表される化合物に対する癌細胞の感受性を検定する方法。

式 (I)

[式中、R<sup>1</sup>は

- 1) 水素原子または
- 2) 水酸基

R<sup>3</sup>は

- 1) 水素原子、
- 2) 水酸基または
- 3) C<sub>1-6</sub> アルコキシ基

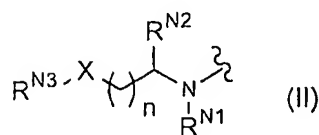
R<sup>2</sup>は

- 1) 水素原子、
- 2) 置換基を有していても良い C<sub>1-6</sub> アルキル基、
- 3) 置換基を有していても良い C<sub>7-10</sub> アラルキル基、



4) 置換基を有していても良い5ないし14員環ヘテロアラルキル基

5) 式 (II)



[式中、

A)

$n$  は0ないし4の整数、

$\text{X}$  は

i)  $-\text{CHR}^{\text{N}4}-$ 、

ii)  $-\text{NR}^{\text{N}5}-$  または

iii)  $-\text{O}-$ 、

$\text{R}^{\text{N}1}$  及び  $\text{R}^{\text{N}2}$  は同一または異なって、

i) 水素原子または

ii)  $\text{C}_{1-6}$  アルキル基、

$\text{R}^{\text{N}3}$  及び  $\text{R}^{\text{N}4}$  は同一または異なって、

i) 水素原子、

ii) 置換基を有していても良い  $\text{C}_{1-6}$  アルキル基、

iii) 置換基を有していても良い不飽和  $\text{C}_{2-10}$  アルキル基、

iv) 置換基を有していても良い  $\text{C}_{1-6}$  アルコキシ基、

v) 置換基を有していても良い  $\text{C}_{6-14}$  アリール基、

vi) 置換基を有していても良い5ないし14員環ヘテロアリール基、

vii) 置換基を有していても良い  $\text{C}_{7-10}$  アラルキル基、

viii) 置換基を有していても良い  $\text{C}_{3-8}$  シクロアルキル基、

ix) 置換基を有していても良い  $\text{C}_{4-9}$  シクロアルキルアルキル基、

x) 置換基を有していても良い5ないし14員環ヘテロアラルキル基、

xi) 置換基を有していても良い5ないし14員環非芳香族複素環式基、

xii)  $-NR^{N6}R^{N7}$  (ここにおいて、 $R^{N6}$  および  $R^{N7}$  は同一または異なって、水素原子または  $C_{1-6}$  アルキル基を表す) または

xiii)  $R^{N3}$  及び  $R^{N4}$  が一緒になって結合する炭素原子と共に形成する置換基を有していても良い5ないし14員環非芳香族複素環式基 (該非芳香族複素環式基は置換基を有していても良い) 、

$R^{N5}$  は

i) 水素原子、

ii) 置換基を有していても良い  $C_{1-6}$  アルキル基、

iii) 置換基を有していても良い不飽和  $C_{2-10}$  アルキル基、

iv) 置換基を有していても良い  $C_{6-14}$  アリール基、

v) 置換基を有していても良い5ないし14員環ヘテロアリール基、

vi) 置換基を有していても良い  $C_{7-10}$  アラルキル基、

vii) 置換基を有していても良い  $C_{3-8}$  シクロアルキル基、

viii) 置換基を有していても良い  $C_{4-9}$  シクロアルキルアルキル基、

ix) 置換基を有していても良い5ないし14員環ヘテロアラルキル基、

x) 置換基を有していても良い5ないし14員環非芳香族複素環式基または

xi)  $R^{N3}$  及び  $R^{N5}$  が一緒になって結合する窒素原子と共に形成する置換基を有していても良い5ないし14員環非芳香族複素環式基 (該非芳香族複素環式基は置換基を有していても良い) 、

B)

X、n、 $R^{N3}$ 、 $R^{N4}$  及び  $R^{N5}$  は前記定義の基を表し、 $R^{N1}$  及び  $R^{N2}$  は一緒になって形成する置換基を有していても良い5ないし14員環非芳香族複素環式基、

C)

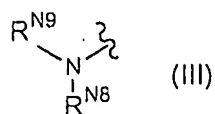
X、n、 $R^{N2}$ 、 $R^{N4}$  及び  $R^{N5}$  は前記定義の基を表し、 $R^{N1}$  及び  $R^{N3}$  は一緒になって形成する置換基を有していても良い5ないし14員環非芳香族複素環式基あるいは

D)

X、n、R<sup>N1</sup>、R<sup>N4</sup>及びR<sup>N5</sup>は前記定義の基を表し、R<sup>N2</sup>及びR<sup>N3</sup>は一緒になって形成する置換基を有していても良い5ないし14員環非芳香族複素環式基を表す]

または

6) 式 (III)



[式中、R<sup>N8</sup>及びR<sup>N9</sup>は同一または異なって、

- i) 水素原子、
- ii) 置換基を有していても良いC<sub>1-6</sub>アルキル基、
- iii) 置換基を有していても良いC<sub>6-14</sub>アリール基、
- iv) 置換基を有していても良い5ないし14員環ヘテロアリール基、
- v) 置換基を有していても良いC<sub>7-10</sub>アラルキル基または
- vi) 置換基を有していても良い5ないし14員環ヘテロアラルキル基を表す]

を表す]

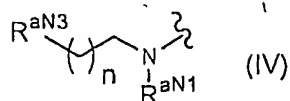
2. R<sup>2</sup>が

- 1) 水素原子、
- 2) 置換基を有していても良いC<sub>1-6</sub>アルキル基、
- 3) 置換基を有していても良いC<sub>7-10</sub>アラルキル基または
- 4) 置換基を有していても良い5ないし14員環ヘテロアラルキル基である請

求項1に記載の検定方法。

3. R<sup>2</sup>が下記式 (IV) で表される請求項1に記載の検定方法。

式 (IV)



[式中、 $n$ は0ないし4の整数、

$R^{aN1}$ は

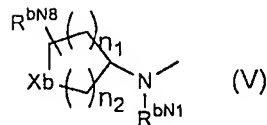
- 1) 水素原子または
- 2)  $C_{1-6}$ アルキル基、

$R^{aN2}$ は

- 1) 水素原子
- 2)  $N-C_{1-6}$ アルキルアミノ基、
- 3)  $N, N$ -ジ $C_{1-6}$ アルキルアミノ基、
- 4) エチルメチルアミノ基、
- 5) ピリジル基、
- 6) ピロリジン-1-イル基、
- 7) ピペリジン-1-イル基、
- 8) モルホリン-4-イル基または
- 9) 4-メチルピペラジン-1-イル基を表す]

4.  $R^2$ が下記式(V)で表される請求項1に記載の検定方法。

式(V)



(式中、 $n_1$ 及び $n_2$ は同一または異なって、0ないし4の整数、

$X_b$ は

- 1)  $-CHR^{bN4}-$ 、

2)  $-NR^{bN5}$ —または

3)  $-O-$ 、

$R^{bN1}$ は

1) 水素原子または

2)  $C_{1-6}$ アルキル基、

$R^{bN8}$ は

1) 水素原子、

2)  $C_{1-6}$ アルキル基、

3)  $C_{6-14}$ アリール基または

4)  $C_{7-10}$ アラルキル基、

$R^{bN4}$ は

1) 水素原子、

2) 置換基を有していても良い $C_{1-6}$ アルキル基、

3) 置換基を有していても良い不飽和 $C_{2-10}$ アルキル基、

4) 置換基を有していても良い $C_{1-6}$ アルコキシ基、

5) 置換基を有していても良い $C_{6-14}$ アリール基、

6) 置換基を有していても良い5ないし14員環ヘテロアリール基、

7) 置換基を有していても良い $C_{7-10}$ アラルキル基、

8) 置換基を有していても良い $C_{3-8}$ シクロアルキル基、

9) 置換基を有していても良い $C_{4-9}$ シクロアルキルアルキル基、

10) 置換基を有していても良い5ないし14員環ヘテロアラルキル基、

11)  $-NR^{bN6}R^{bN7}$  (ここにおいて、 $R^{bN6}$ および $R^{bN7}$ は、同一または異なって、水素原子または $C_{1-6}$ アルキル基を表す) または

12) 置換基を有していても良い5ないし14員環非芳香族複素環式基、

$R^{bN5}$ は

1) 水素原子、

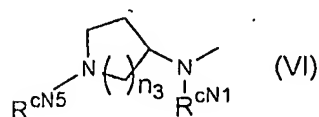
2) 置換基を有していても良い $C_{1-6}$ アルキル基、

3) 置換基を有していても良い不飽和 $C_{2-10}$ アルキル基、

- 4) 置換基を有していても良いC<sub>6-14</sub>アリール基、
- 5) 置換基を有していても良い5ないし14員環ヘテロアリール基、
- 6) 置換基を有していても良いC<sub>7-10</sub>アラルキル基、
- 7) 置換基を有していても良いC<sub>3-8</sub>シクロアルキル基、
- 8) 置換基を有していても良いC<sub>4-9</sub>シクロアルキルアルキル基、
- 9) 置換基を有していても良い5ないし14員環ヘテロアラルキル基または
- 10) 置換基を有していても良い5ないし14員環非芳香族複素環式基を表す]

5. R<sup>2</sup>が下記式(VI)で表される請求項1に記載の検定方法。

式(VI)



[式中、n<sub>3</sub>は1または2の整数、

R<sup>CN1</sup>は

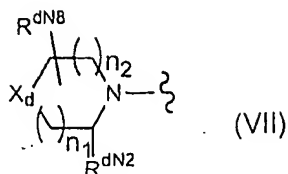
- 1) 水素原子または
- 2) C<sub>1-6</sub>アルキル基、

R<sup>CN5</sup>は

- 1) 水素原子または
- 2) C<sub>1-6</sub>アルキル基を表す]

6. R<sup>2</sup>が下記式(VII)で表される請求項1に記載の検定方法。

式(VII)



(式中、 $n_1$  及び  $n_2$  は同一または異なって、0 ないし 4 の整数、

$X_d$  は

- 1)  $-\text{CHR}^{\text{dN4}}-$ 、
- 2)  $-\text{NR}^{\text{dN5}}-$  または
- 3)  $-\text{O}-$ 、

$R^{\text{dN2}}$  は

- 1) 水素原子または
- 2)  $\text{C}_{1-6}$  アルキル基、

$R^{\text{dN8}}$  は

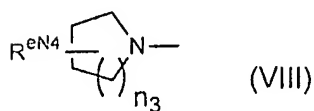
- 1) 水素原子、
- 2)  $\text{C}_{1-6}$  アルキル基、
- 3)  $\text{C}_{6-14}$  アリール基または
- 4)  $\text{C}_{7-10}$  アラルキル基、

$R^{\text{dN4}}$  は

- 1) 水素原子、
- 2) 置換基を有していても良い  $\text{C}_{1-6}$  アルキル基、
- 3) 置換基を有していても良い不飽和  $\text{C}_{2-10}$  アルキル基、
- 4) 置換基を有していても良い  $\text{C}_{1-6}$  アルコキシ基、
- 5) 置換基を有していても良い  $\text{C}_{6-14}$  アリール基、
- 6) 置換基を有していても良い 5 ないし 14 員環ヘテロアリール基、
- 7) 置換基を有していても良い  $\text{C}_{7-10}$  アラルキル基、
- 8) 置換基を有していても良い  $\text{C}_{3-8}$  シクロアルキル基、
- 9) 置換基を有していても良い  $\text{C}_{4-9}$  シクロアルキルアルキル基、

- 10) 置換基を有していても良い5ないし14員環ヘテロアルキル基、
- 11)  $-NR^{dN6}R^{dN7}$  (ここにおいて、 $R^{dN6}$  及び  $R^{dN7}$  は同一または異なって、水素原子または  $C_{1-6}$  アルキル基を表す) または
- 12) 置換基を有していても良い5ないし14員環非芳香族複素環式基、  
 $R^{dN5}$  は
- 1) 水素原子、
  - 2) 置換基を有していても良い  $C_{1-6}$  アルキル基、
  - 3) 置換基を有していても良い不飽和  $C_{2-10}$  アルキル基、
  - 4) 置換基を有していても良い  $C_{6-14}$  アリール基、
  - 5) 置換基を有していても良い5ないし14員環ヘテロアリール基、
  - 6) 置換基を有していても良い  $C_{7-10}$  アラルキル基、
  - 7) 置換基を有していても良い  $C_{3-8}$  シクロアルキル基、
  - 8) 置換基を有していても良い  $C_{4-9}$  シクロアルキルアルキル基、
  - 9) 置換基を有していても良い5ないし14員環ヘテロアルキル基または
  - 10) 置換基を有していても良い5ないし14員環非芳香族複素環式基を表す]

7.  $R^2$  が下記式 (VIII) で表される請求項1に記載の検定方法。  
 式 (VIII)



[式中、 $n_3$  は1ないし3の整数、

$R^{eN4}$  は

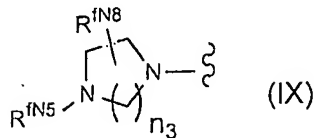
- 1) アミノ基、
- 2)  $N-C_{1-6}$  アルキルアミノ基、
- 3) ピロリジン-1-イル基、



- 4) ピペリジン-1-イル基または  
5) モルホリン-4-イル基を表す]

8.  $R^2$ が下記式 (IX) で表される請求項1に記載の検定方法。

式 (IX)



[式中、 $n_3$ は1ないし3の整数、

$R^{fN8}$ は

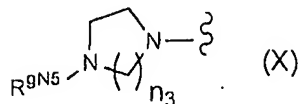
- 1) 水素原子、
- 2)  $C_{1-6}$ アルキル基、
- 3)  $C_{6-14}$ アリール基または
- 4)  $C_{7-10}$ アラルキル基、

$R^{fN5}$ は

- 1) 水素原子、
- 2) 置換基を有していても良い $C_{1-6}$ アルキル基、
- 3) 置換基を有していても良い $C_{3-8}$ シクロアルキル基、
- 4) 置換基を有していても良い3ないし8員環非芳香族複素環式基、
- 5) 置換基を有していても良い $C_{6-14}$ アリール基、
- 6) 置換基を有していても良い5ないし14員環ヘテロアリール基、
- 7) 置換基を有していても良い $C_{7-10}$ アラルキル基、
- 8) 置換基を有していても良い5員環ないし14員環ヘテロアラルキル基または
- 9) 置換基を有していても良い $C_{4-9}$ シクロアルキルアルキル基を表す]

9.  $R^2$ が下記式 (X) で表される請求項1に記載の検定方法。

式 (X)

[式中、 $n_3$  は 1 ないし 3 の整数、 $R^{9N5}$  は

- 1) 水素原子、
- 2) 置換されていてもよい  $C_{1-6}$  アルキル基、
- 3) 置換されていてもよい  $C_{3-8}$  シクロアルキル基、
- 4) 置換されていてもよい  $C_{4-9}$  シクロアルキルアルキル基、
- 5) 置換されていてもよい  $C_{7-10}$  アラルキル基、
- 6) 置換されていてもよいピリジル基または
- 7) 置換されていてもよいテトラヒドロピラニル基を表す]

10. 一般式 (I) で表される化合物が下記化合物の何れか一つの化合物である、請求項 1 に記載の検定方法。

- 1) (8E, 12E, 14E) - 7-アセトキシ-3, 6, 21-トリヒドロキシ-6, 10, 12, 16, 20-ペンタメチル-18, 19-エポキシトリコサ-8, 12, 14-トリエン-11-オリド
- 2) (8E, 12E, 14E) - 7-((4-シクロヘプチルピペラジン-1-イル)カルボニル)オキシ-3, 6, 16, 21-テトラヒドロキシ-6, 10, 12, 16, 20-ペンタメチル-18, 19-エポキシトリコサ-8, 12, 14-トリエン-11-オリド、
- 3) (8E, 12E, 14E) - 3, 6, 16, 21-テトラヒドロキシ-7-((4-イソプロピルピペラジン-1-イル)カルボニル)オキシ-6, 10, 12, 16, 20-ペンタメチル-18, 19-エポキシトリコサ-8, 12, 14-トリ

エン-11-オリド及び

4) (8E, 12E, 14E)-3, 6, 16, 21-テトラヒドロキシ-6, 10, 12, 16, 20-ペンタメチル-7-((4-メチルピペラジン-1-イル)カルボニル)オキシ-18, 19-エポキシトリコサ-8, 12, 14-トリエン-11-オリド

11. pRB の発現の減少、p16 の発現、または cyclin E の発現の増強を、それぞれをコードする mRNA 量を測定することにより検定する、請求項 1 に記載の検定方法。

12. mRNA 量を測定する方法が定量的 RT-PCR 法である、請求項 11 に記載の検定方法。

13. mRNA 量を測定する方法が DNA チップ法である、請求項 11 に記載の検定方法。

14. pRB の発現の減少、p16 の発現、または cyclin E の発現の増強を、それぞれの蛋白質量を測定することにより検定する、請求項 1 に記載の検定方法。

15. 蛋白質量を測定する方法がウェスタンブロット法である、請求項 14 に記載の検定方法。

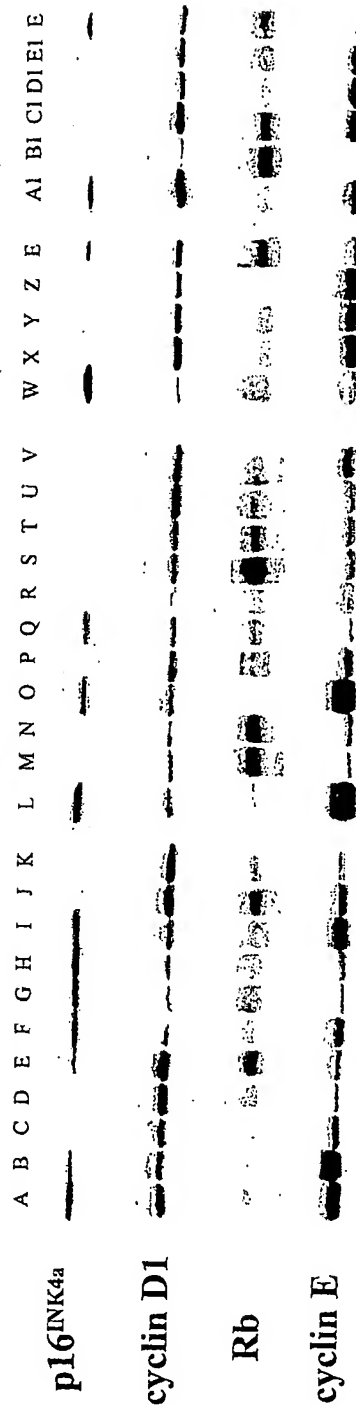
16. 蛋白質量を測定する方法が免疫組織染色法である、請求項 14 に記載の検定方法。

17. 蛋白質量を測定する方法が ELISA 法である、請求項 14 に記載の検定方法。

18. pRB、p16 または cyclin E 遺伝子の連続した少なくとも 15 塩基の配列から成るプライマーを含んで成る、請求項 12 の検定方法に使用するキット。

19. pRB、p16 または cyclin E に対する抗体を含んで成る、請求項 15、16 または 17 に記載の検定方法に使用するキット。

☒ 1



2

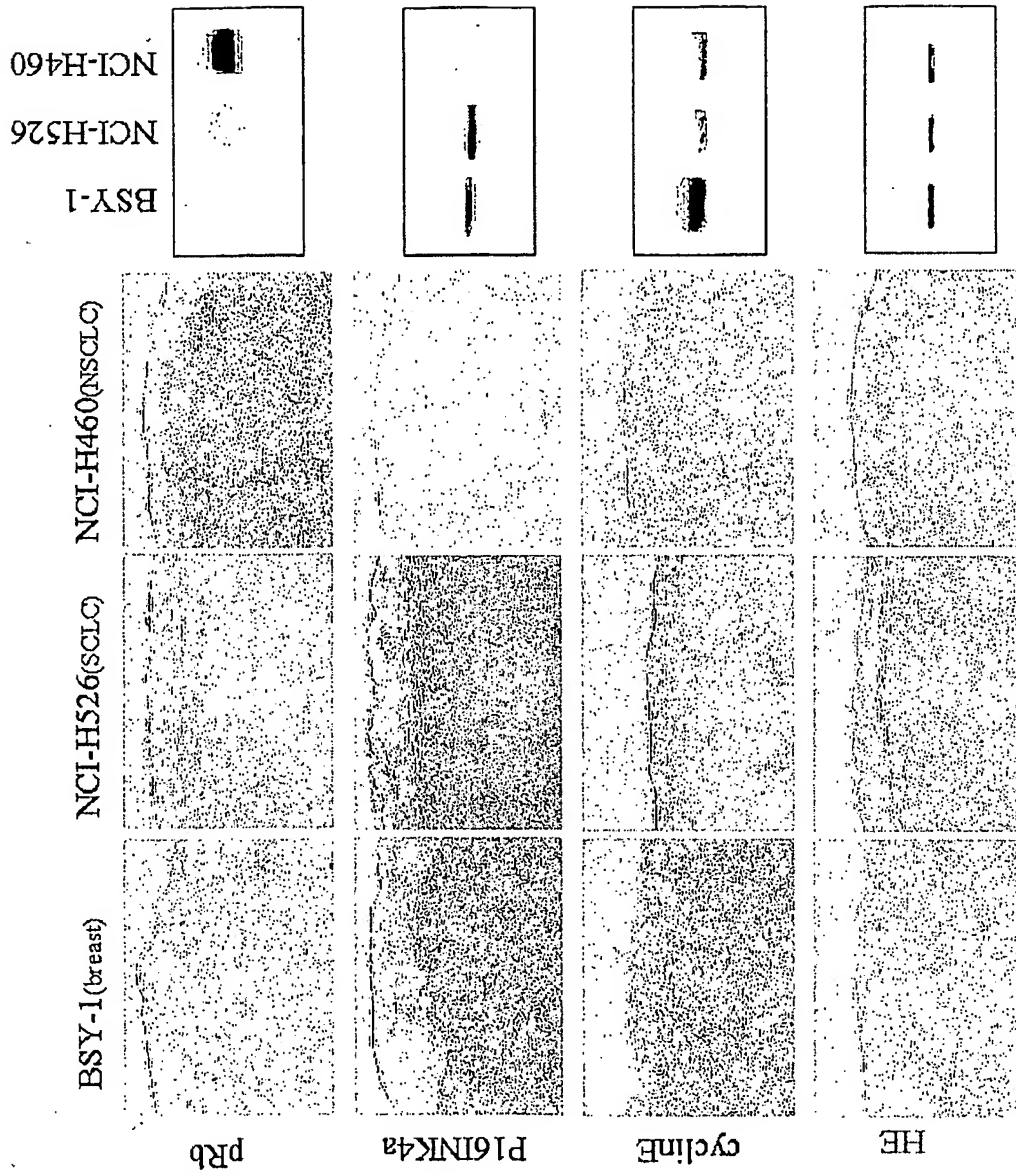


図 3

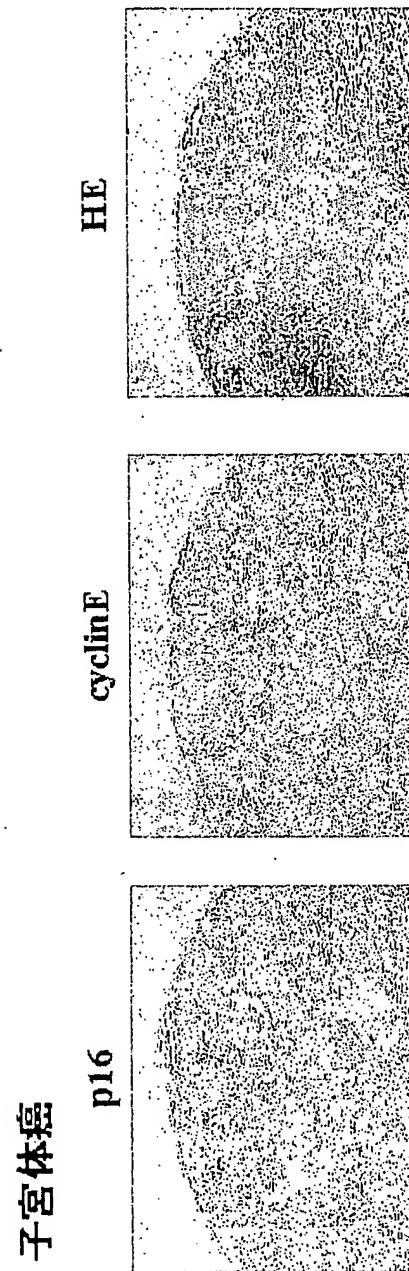
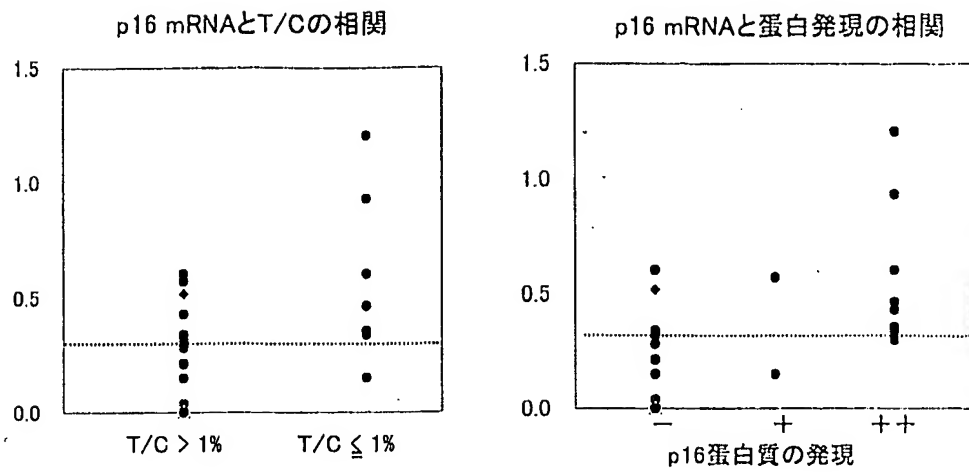


図 4





**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☒ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:**

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**